



FÉDÉRATION DES INDUSTRIES  
DE LA PARFUMERIE

PRODUITS DE PARFUMERIE, DE BEAUTÉ ET DE TOILETTE

CIRCULAIRE N° 97016 QUESTIONS TECHNIQUES N° 2

Emetteur : Anne DAHINGER-BROOMER/fl

15.01.97

ARRETE DU 29 NOVEMBRE 1996

*METHODE OFFICIELLE POUR EVALUER LE POTENTIEL IRRITANT  
DES COSMETIQUES*

Par arrêté du 29 novembre publié au JORF du 26 décembre 1996, l'arrêté du 5 avril 1971 relatif aux méthodes officielles d'analyse des produits cosmétiques est complété par une nouvelle méthode d'évaluation du potentiel irritant.

Il s'agit d'une méthode *in vitro* dite alternative ou complémentaire à l'expérimentation animale, dont le principe repose sur l'observation de la membrane chorio-allantoïdienne d'œufs de poule après dix jours d'incubation.

Cette méthode connue en anglais sous l'abréviation HET-CAM (Hen Eggtest-Chorioallantoic Membrane) a été publiée en 1986 (N.P. Luepke et F.H. Kemper) dans le journal « Food and Chemical Toxicology » et fait l'objet de nombreuses études de validations, dont le travail de O. Blein-Sella commandité par l'OPAL qui a fait l'objet d'une thèse présentée à Paris en 1991.

Cette méthode très sensible peut être utilisée pour l'évaluation du potentiel irritant oculaire des produits cosmétiques qui contiennent notamment des tensioactifs.

Le texte de la méthode est joint en annexe de cette circulaire.

PJ : 1

**CIRCULAIRE N° 97016**

*Le présent document est dans sa totalité exclusivement réservé aux adhérents de la Fédération, il reste sa propriété et elle en interdit la diffusion et la communication à des tiers sans son autorisation.*

1. PLACE DU GÉNÉRAL CATROUX 75017 PARIS  
TEL. 01 44 18 83 83 TÉLÉCOPIE 01 44 18 83 84  
ADRESSE POSTALE : BP 104 04 75014 PARIS CEDEX 17

Ces informations peuvent être apportées sous forme de pictogrammes.

## II. - Risques particuliers

### 1. Choix du site :

a) L'accès immédiat de l'aire de jeux doit être aménagé de façon à protéger les utilisateurs et les tiers contre les risques liés à la circulation des véhicules à moteur ;

b) Les plantes et arbres présents sur les aires de jeux doivent être choisis, implantés et protégés de façon à ne pas occasionner d'accidents pour les enfants (empoisonnements ou blessures).

### 2. Aménagement :

a) Les équipements et les zones de sécurité qui les entourent doivent être dégagés de tout obstacle ne faisant pas partie intégrante du jeu ;

b) Les limites des zones présentant des risques particuliers, comme les abords des balançoires ou des tourniquets, doivent être matérialisées de manière que, dans leur utilisation normale ou raisonnablement prévisible, ils n'occasionnent pas de heurts entre les enfants utilisant l'équipement et ceux qui ne l'utilisent pas ;

c) Les jeux utilisant l'eau doivent être conçus de manière à écartier tout risque de noyade ou d'infection raisonnablement prévisible ;

d) Les bacs à sable doivent être maintenus dans des conditions d'hygiène satisfaisantes ;

e) Les équipements doivent être implantés de manière que les usagers puissent, en toutes circonstances, accéder à tous les endroits où les enfants sont susceptibles de se trouver ;

f) Les éléments des équipements doivent être installés de façon à assurer la stabilité de ces derniers et à éviter ainsi tout risque de renversement, de chute ou de déplacement inopiné ;

g) Lorsque cela est prévu par la notice d'installation, les équipements doivent être fixés au sol.

### 3. Matériaux de revêtement et de réception :

a) Les zones sur lesquelles les enfants sont susceptibles de tomber alors qu'ils utilisent les équipements doivent être revêtues de matériaux amortissants appropriés ;

b) La durée de vie des matériaux amortissants utilisés doit correspondre à leur utilisation sur une aire collective de jeux, notamment pour ce qui concerne les processus d'usure et de vieillissement et les effets des variations climatiques. Les matériaux de remblai doivent être appliqués en couche suffisamment épaisse pour en permettre une bonne répartition.

c) Les matériaux de revêtement de l'aire de jeux doivent satisfaire aux conditions d'hygiène et de propreté permettant d'éviter toute souillure ou contamination.

### 4. Entretien et maintenance :

a) Les exploitants ou gestionnaires doivent élaborer un plan d'entretien de l'aire de jeux et un plan de maintenance des équipements qui y sont implantés et respecter ces plans. Ces derniers doivent mentionner le nom ou la raison sociale du ou des organismes chargés de les exécuter ainsi que la nature et la périodicité des contrôles à effectuer ;

b) Les exploitants ou gestionnaires doivent organiser l'inspection périodique de l'aire de jeux et de ses équipements, pour en vérifier l'état et pour déterminer les actions de réparation et d'entretien qui doivent être entreprises. La nature et la fréquence des inspections doivent être fonction, notamment, des instructions du fabricant, du degré de fréquentation de l'aire de jeux et des conditions climatiques ;

c) L'accès aux équipements qui ne répondent plus aux exigences de sécurité légales ou réglementaires doit être interdit ;

d) Les plans, ainsi qu'un registre comportant, pour chaque site, la date et le résultat des contrôles effectués, seront tenus à la disposition des agents de contrôle, habilités à cet effet par l'article L. 222-1 du code de la consommation.

Arrêté du 29 novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyse nécessaires aux contrôles des produits cosmétiques

NOR : AGEC3600217A

Le ministre délégué aux finances et au commerce extérieur,

Vu le code de la consommation ;

Vu le décret du 22 janvier 1919 modifié portant règlement d'administration publique pour l'application de la loi du 1<sup>er</sup> août 1905 sur la répression des fraudes, et notamment ses articles 3 et 20 ;

Vu l'arrêté du 5 avril 1971 relatif aux méthodes officielles d'analyse de cosmétiques et produits de beauté, modifié en dernier lieu par l'arrêté du 11 mai 1993 ;

Vu l'avis de la commission générale d'unification des méthodes d'analyse,

## Arrête :

Art. 1<sup>er</sup>. - L'arrêté du 5 avril 1971 susvisé relatif aux méthodes officielles d'analyse de cosmétiques et produits de beauté est complété par une annexe IV intitulée « Méthode officielle d'évaluation du potentiel irritant par application sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'œuf de poule » qui figure en annexe du présent arrêté.

Art. 2. - Le directeur général de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes est chargé de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait à Paris, le 29 novembre 1996.

Pour le ministre et par délégation :  
Le directeur général de la concurrence,  
de la consommation  
et de la répression des fraudes,  
C. BABUSLAUX

## ANNEXE IV

### MÉTHODE OFFICIELLE D'ÉVALUATION DU POTENTIEL IRRITANT PAR APPLICATION SUR LA MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDIENNE DE L'ŒUF DE POULE

#### Objectif et principe

Cette méthode est une alternative à l'expérimentation animale pour l'évaluation du potentiel irritant des produits cosmétiques.

Le principe en est basé sur l'observation, par une personne entraînée, des effets irritants (hyperémie, hémorragie, coagulation) pouvant survenir dans les cinq minutes suivant le dépôt d'un produit sur la membrane chorio-allantoïdienne (MCA) d'œuf de poule embryonné, au dixième jour d'incubation.

Dans le cas des produits cosmétiques, notamment à base de tensioactifs, cette méthode est applicable à l'évaluation du potentiel irritant oculaire.

#### Matériel (liste indicative)

Œufs de poule embryonnés (la souche White Leghorn est recommandée), d'un poids compris entre 50 et 65 g le jour de la réception.

Enceinte thermostatée.  
Incubateur à œufs.  
Lampe à rincer les œufs.  
Pince anatomique droite (pince à disséquer, brucelles, ...) à bouts mousse et sans mors.  
Ciseaux à bouts ronds.  
Bain thermostaté à 37 °C.  
Chronomètre.  
Pipettes, tubes à essai, béchers...  
Seringues de 1 ml à 5 ml.  
Balance de précision.  
Soluté injectable de pentobarbital.  
Eau pour préparations injectables.  
Soluté isotonique de NaCl à 0,9 p. 100.

#### Protocole expérimental

##### Réception des œufs

Dès réception, les œufs fêlés ou cassés sont éliminés. Les autres sont conservés à l'abri de la lumière et à une température de 12 °C ± 1 °C (enceinte ou local adapté) pendant au moins vingt-quatre heures avant de les placer en couveuse.

##### Mise en couveuse

Les œufs sont pesés et identifiés puis placés dans l'incubateur (température optimale : 37,8 °C, humidité comprise entre 50 et 60 p. 100). Si l'incubateur n'est pas équipé d'un système de retournement automatique, les œufs doivent être retournés manuellement au moins deux fois par jour.

Pendant toute la durée de l'incubation, la température et l'humidité sont contrôlées et réglées si nécessaire.

Les œufs sont placés en position verticale (poche d'air vers le haut) dès le début dans le cas d'incubateurs équipés de plateaux oscillants et au huitième jour d'incubation dans les autres cas.

##### Vérification des œufs

Au dixième jour d'incubation, les œufs sont murés et les œufs défectueux sont rejetés.

### Essai proprement dit

Les différentes étapes de l'essai sont enchaînées rapidement sous un éclairage d'une intensité suffisante ne dégageant pas de chaleur afin de ne pas dessécher la MCA. Dans le cas contraire, l'atmosphère est humidifiée à l'aide, par exemple, d'un brumisateur.

L'œuf étant placé verticalement sur un support (poche d'air vers le haut), la coquille est encaillée au niveau de la poche d'air en prenant soin de ne pas léser la MCA. À l'aide d'une pince ou d'une paire de ciseaux à bouts ronds, la coquille est enlevée jusqu'au niveau de la membrane coquillière. Toute la surface de la membrane coquillière est alors humidifiée avec du soluté isotonique de chlorure de sodium tédi à 37 °C. Le soluté est ensuite éliminé par inclinaison de l'œuf. Avec une pince la membrane coquillière est décollée délicatement puis retirée afin de découvrir la membrane chorio-allantoïdienne sous-jacente.

Tout œuf dont la membrane chorio-allantoïdienne est défectueuse ou présente des traces d'hémorragie est rejeté.

0,20 ml du produit à l'essai (pur ou dilué), maintenu à 37 °C, sont alors déposés délicatement sur la MCA à l'aide d'une seringue ou d'une pipette et le chronomètre est aussitôt déclenché. Après 20 secondes de contact, la membrane est rincée avec 5 ml de soluté isotonique de chlorure de sodium (maintenu à 37 °C) à l'aide d'une seringue en évitant toute projection brutale. Le liquide de rinçage est éliminé par inclinaison de l'œuf. Les éventuels phénomènes d'irritation sont observés pendant 5 minutes selon la procédure décrite ci-après. Le temps exact d'apparition de chaque phénomène est relevé.

L'effet irritant du produit à l'essai (ou de chacune de ses dilutions) est évalué sur quatre œufs. En fin d'essai, les œufs reçoivent une injection de pentobarbital puis sont éliminés.

### Procédure de lecture

Les observations prises en compte pour la notation du produit doivent être réalisées à l'œil nu.

Les phénomènes observés (hyperémie, hémorragie, coagulation) se sont pas retenus en fonction de leur intensité mais en fonction de leur présence : il s'agit d'une réponse de type tout ou rien.

Le temps est noté à l'apparition de chacun des phénomènes.

#### Hyperémie

Phénomène observé : des capillaires non visibles avant l'ajout du produit deviennent visibles, alors que les capillaires visibles se dilatent et deviennent plus rouges. Ce phénomène peut également affecter les vaisseaux de diamètre supérieur.

#### Hémorragie

Phénomène observé : Éberation de sang s'échappant des vaisseaux et/ou des capillaires, pouvant se présenter sous différents aspects, et notamment en « choc-fleur », en nappe, en voile diffus, en piquets (le sang s'échappe ponctuellement à différents endroits de la membrane).

Il est à noter que :

- l'hémorragie peut présenter un caractère éphémère ; elle doit néanmoins être prise en compte ;
- l'observation, dans les 30 premières secondes, d'une hémorragie massive impose la prise en compte de l'hyperémie masquée.

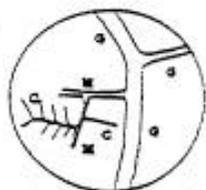
#### Coagulation (opacité et/ou thrombose)

Opacité :

Phénomène observé : apparition sur tout ou partie de la membrane, soit d'un voile opalescent évoluant éventuellement vers une opacification, soit d'une opacification directe.

Il est nécessaire de vérifier que le phénomène n'est pas lié au comportement physicochimique du produit en milieu aqueux (par exemple formation d'un colloïde, d'un précipité, ...).

### Thrombose :



G = gros vaisseaux  
M = vaisseaux moyens  
C = capillaires

Phénomène observé : rupture du flux sanguin dans les vaisseaux se traduisant par un aspect segmenté (alternance d'étranglements et de zones turgescents plus ou moins sombres).

Il est à noter que les observations ne doivent pas prendre en compte les modifications intervenues au niveau des capillaires.

### Résultats

Les phénomènes observés sont quantifiés selon le tableau ci-après, en fonction de leur délai d'apparition :

#### Notation en fonction du temps

| PHÉNOMÈNE             | TEMPS    |                 |                 |
|-----------------------|----------|-----------------|-----------------|
|                       | 1 ≤ 30 s | 30 s < t ≤ 2 mn | 2 mn < t ≤ 5 mn |
| Hyperémie _____       | 5        | 3               | 1               |
| Hémorragie _____      | 7        | 5               | 3               |
| Coagulation (*) _____ | 9        | 7               | 5               |

(\*) Coagulation = opacité et/ou thrombose.

Le score pour chaque œuf est la somme des notes d'hyperémie, d'hémorragie et de coagulation. La notation du produit testé est la moyenne arithmétique, arrondie à une décimale des scores obtenus sur quatre œufs. La notation maximum est 21.

Le potentiel irritant sur la membrane chorio-allantoïdienne du produit à l'essai (pur ou dilué) est donné par l'échelle suivante :

#### Notation (N)

N < 1.  
1 ≤ N < 5.  
5 ≤ N < 9.  
N ≥ 9.

#### Classification

Pratiquement non irritant.  
Faiblement irritant.  
Modérément irritant.  
Irritant.

### Remarques importantes

Il est à noter que la reproductibilité des résultats est d'autant meilleure que la personne réalisant l'essai est entraînée et que les conditions expérimentales sont respectées.

De manière à vérifier la qualité des conditions opératoires et celle des expérimentateurs, il est conseillé de procéder régulièrement à des contrôles à l'aide d'une référence. À cet effet, l'établissement préalable d'une courbe étalon avec des solutions aqueuses à 0,05 p. 100 - 0,4 p. 100 et 3,2 p. 100 (m/v) de lauryl sulfobetaine est recommandé.

L'expérimentateur appréciera le potentiel irritant du produit à l'essai par comparaison aux données acquises pour des produits de même catégorie.

Le rapport d'essai doit comporter toutes les indications prévues par les règles de bonne pratique de laboratoire.

### Bibliographie

- LUEPKE N.P. The Hen's egg test (HET) : « An alternative toxicity test ». *Brit. J. Dermatol.* 1986, 115, Suppl. 31, 133-135.  
LUEPKE N.P. & KEMPER F.H. The HET-CAM test : « An alternative to the Draize eye test ». *Food Chem. Toxicol.* 1986, 24, n° 6/7, 495-496.